



## 저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학석사학위논문

품종별 청고추의 항산화 효과 및 유방암  
세포주에서의 세포사멸 연구

Effects of Green Pepper on Antioxidant Activity  
and Induction of Apoptosis and Necrosis  
in Human Breast Cancer Cell Lines

2012년 6월

서울대학교 대학원

식품영양학과

윤 효 진

품종별 청고추의 항산화 효과 및 유방암  
세포주에서의 세포사멸 연구

Effects of Green Pepper on Antioxidant Activity and Induction of  
Apoptosis and Necrosis in Human Breast Cancer Cell Lines

지도교수 황 인 경

이 논문을 생활과학석사 학위논문으로 제출함  
2012년 6월

서울대학교 대학원  
식품영양학과  
윤 효 진

윤효진의 생활과학석사 학위논문을 인준함  
2012년 6월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)  
부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 국문초록

본 연구에서는 국내·외 품종별 green pepper에 있는 비타민 C, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드를 비롯하여 고추에 주로 함유된 flavonoids인 quercetin, luteolin, apigenin의 양을 측정하고, 이들로 인한 항산화 효과와 더불어 유방암 세포에서의 apoptosis를 통한 세포 사멸 유도에 관한 연구를 수행하였다. 이에 국내산 green pepper의 flavonoids에 대한 기초 자료를 제공하고, 이들의 항산화 효과 및 유방암 세포에서의 apoptosis를 통하여 암을 비롯한 다양한 질병의 예방에 있어 잠재적인 가치를 알아보고자 하였다.

풋고추, 청양고추, 파리고추, 오이고추, 할라피뇨의 5가지 품종의 flavonoids를 분석한 결과, 그 함량에 있어서 luteolin, quercetin, apigenin의 순으로 측정되었으며, 품종 간에는 파리고추의 flavonoids가 유의적으로 가장 높게 나타났다. 비타민 C의 함량은 파리고추가 가장 높았으며, 그 다음 청양고추, 할라피뇨, 풋고추, 오이고추의 순으로 측정되었다. 또한 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 파리고추가 유의적으로 높게 측정되었는데 이는 DPPH, ABTS 자유기 소거 활성능에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

Green pepper 추출물의 세포 성장에 미치는 영향을 살펴본 결과, human breast cancer cell인 MCF-7과 MDA-MB-231에서 5가지 품종 모두 농도 의존적으로 유의적인 증식 억제능을 갖고 있었다. 특히 파리고추에서  $IC_{50}$  값이 826  $\mu\text{g/mL}$ , 719  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮게 측정되어 증식 억제 효과가 가장 우수하게 나타났다.

Necrosis로 인한 세포 사멸 효과는 파리고추 추출물을 처리하였을 때, 농도 의존적으로 LDH가 분비되며, plasma membrane integrity의 감소가 이루어지는 것을 확인하였다.

Apoptosis의 확인 인자로 Bax, cleaved caspase-3, PARP를 측정한 결과, 파리고추 추출물에서 농도 의존적으로 apoptosis로 인한 세포사멸 효

과를 나타내었다.

이상의 결과들을 통하여, green pepper에는 luteolin, quercetin 및 apigenin의 flavonoids를 비롯하여 vitamin C 등 여러 기능성 성분을 함유하고 있으며, 특히 파리고추가 5가지 품종 가운데 항산화 및 항암능 측정에서 가장 높은 활성을 갖고 있었으며, 유방암세포에서 apoptosis로 인한 세포 사멸 효과를 나타내고 있는 것을 확인하였다.

이에 국내산 green pepper의 flavonoids의 정성·정량에 있어서 기초자료가 될 것으로 기대되며, 이들의 항산화 효과와 더불어 유방암 예방 및 치료에 있어서 잠재적인 가치를 기대할 수 있다.

주요어 : green pepper, cultivar, flavonoid, antioxidant, necrosis, apoptosis

학 번 : 2010-23612

# 목 차

국문초록	i
목차	iii
표목차	v
그림목차	vi
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	5
1. 실험재료	5
2. 실험방법	
2.1. 메탄올 추출	5
2.2. 기능성 성분 분석	6
2.2.1. 플라보노이드 분석	6
2.2.2. 비타민 C 함량	8
2.2.3. 총 폴리페놀 함량	8
2.2.4. 총 플라보노이드 함량	9
2.3 항산화 활성 측정	9
2.3.1. DPPH 자유기 소거 활성능	9
2.3.2. ABTS 자유기 소거 활성능	10
2.4 고추추출물의 세포사멸 효과 측정	11
2.4.1. 유방암 세포의 증식 억제 효과	11
2.4.2. Necrosis 측정	11
2.4.3. Apoptosis 측정	12
2.4.3.1. Bax, cleaved caspase-3, PARP 측정	12
3.1 통계처리	13

III. 실험결과 및 고찰	14
1. 추출 수율	14
2. 기능성 성분 분석	16
2.1. 플라보노이드 분석	16
2.2. 비타민 C 함량	26
2.3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량	28
3. 항산화 활성	31
3.1. DPPH 자유기 소거 활성능	31
3.2. ABTS 자유기 소거 활성능	33
3.3. Green pepper의 기능성 성분과 항산화 활성 간의 상관관계	36
4. 고추추출물의 세포사멸 효과	38
4.1. 유방암 세포의 증식 억제 효과	38
4.2. Necrosis	43
4.3. Apoptosis	45
4.3.1. Bax	45
4.3.2. cleaved caspase-3, PARP	47
IV. 요약 및 결론	50
참고문헌	52
Abstract	61

## 표 목차

Table 1. Operating condition of HPLC . . . . .	7
Table 2. Yield(%) of 80% methanol extracts of green pepper cultivars .	15
Table 3. Flavonoid contents of green pepper cultivars . . . . .	25
Table 4. Contents of total polyphenol and total flavonoid in green pepper cultivars . . . . .	30
Table 5. DPPH radical scavenging activity of methanol extract from various green pepper . . . . .	32
Table 6. ABTS radical scavenging activity of methanol extract from various green pepper . . . . .	34
Table 7. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg VCEAC/g, dry basis) of methanol extract from various green pepper . . . .	35
Table 8. Correlation coefficients between the contents of functional substances and antioxidant effects by DPPH, ABTS assay from green pepper extracts . . . . .	37
Table 9. Effect of methanol extract from various leaves on cell viability in A: MCF-7 cells, B : MDA-MB-231 cells . . . . .	42



## 그림 목차

Figure 1. Structures of estrogen and flavonids	4
Figure 2. HPLC profile of luteolin standard, UV detection at 360nm	17
Figure 3. HPLC profile of quercetin standard, UV detection at 360nm	18
Figure 4. HPLC profile of apigenin standard, UV detection at 360nm	19
Figure 5. HPLC profile of phut pepper, UV detection at 360nm	20
Figure 6. HPLC profile of cheonyang pepper, UV detection at 360nm	21
Figure 7. HPLC profile of kkuari pepper, UV detection at 360nm	22
Figure 8. HPLC profile of ohi pepper, UV detection at 360nm	23
Figure 9. HPLC profile of jalapeno pepper, UV detection at 360nm	24
Figure 10. Contents of Vitamin C in green pepper methanol extracts	27
Figure 11. Effect of methanol extract from various leaves on cell viability in MCF-7 cells	40
Figure 12. Effect of methanol extract from various leaves on cell viability in MDA-MB-231 cells	41
Figure 13. Effect of kkuari pepper extracts on necrosis using the LDH assay in MCF-7 cells	44
Figure 14. Bax induced by Kkuari pepper in MCF-7	46
Figure 15. Cleaved caspase-3 induced by Kkuari pepper in MCF-7	48
Figure 16. PARP cleavage induced by Kkuari pepper in MCF-7	49

# I. 서론

고추(*Capsicum annuum*)는 아시아를 포함하여 전 세계적으로 가장 많이 섭취하고 있는 채소 중 하나이다. 특히 우리나라에서는 대표음식인 김치의 주재료 중 하나로써, 오래전부터 식생활에 있어 식재료로 가장 많이 사용되고 있다. 고추에는 capsaicin을 비롯하여 비타민 A, C 등 다양한 영양성분을 함유하고 있다. 이러한 영양성분으로 인하여 고추 섭취로 인한 대사증후군의 예방 및 항암, 항산화, 항염 효과 등에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다(Dan 등 2011, Surh 등 1995, Jang 등 1998).

이렇듯 고추에는 많은 생리 활성 물질을 포함하고 있음에도 불구하고, red pepper의 capsaicin 등의 연구에 치우쳐 green pepper의 flavonoids에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 또한 국외의 green vegetable flavonoids에 관한 많은 연구에서 green pepper를 다루고 있으나, pepper의 영양성분은 성숙도, 유전자형, 재배환경 및 공정과정에 따라 많은 영향을 받기 때문에, 국내 green pepper에 관한 연구는 별도로 수행되어야 한다.

Flavonoids는 다양한 식물에 존재하고 있으며 carotenoid 색소와 함께 중요한 색소중의 하나이다. 식물체에 있는 flavonoid는 방어기작으로 인하여 2차 대사산물의 결과 생성된 것으로, 세포에서의 유도인자 및 항독성 물질 역할을 한다(Dixon 1986, Laks 1989). 이에 식물체에 plant nutrition으로써의 역할과 더불어 non-toxic할 뿐만 아니라, 인간에게도 잠재적으로 이로운 영향을 갖고 있다(Keller 2009). Flavonoids의 기능성에 대한 연구로는 항산화, 항염, 항알러지 효과(Havesteen 1983)와 더불어 항암효과(Verma 등 1988, Yoshida 등 1990, Laughton 등 1991) 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있다. 또한 flavonoids는 estrogen과 구조가 유사하기 때문에(Fig 1), estrogen-like activity뿐만 아니라 estrogen antagonistic activity를 기대할 수 있다(Warren 등 2002, Schlachterman 등 2008). 이에 유방암의 예방 및 치료에 있어서 그 가치를 기대해 볼 수 있으며, 이에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다(So 등 1997, Baila 등 1998,

Wang 등 2010, Choi 등 2009).

유방암은 여성의 가장 흔한 암 중의 하나로써, 통계에 따르면 국내 여성 10만 명당 1만 3천 여명 정도의 발병률을 지니고 있다. 또한 암의 발병 종류 중에서 지속적으로 높은 발생률을 차지하고 있다(국가 암 정보센터 2009). 미국의 경우, 2005년 약 130만 명의 유방암의 발병과 약 57만 명의 여성이 유방암으로 사망하였으며, 매년 백만명 이상의 여성들이 유방암으로 진단받는 것으로 보고되었다(Jemal 등 2005, Stewart 등 2003). 이처럼 유방암은 전 세계적으로 여성에게 있어서 위협적인 존재이며, 국내 유방암의 발생률 또한 식생활의 변화로 인하여 꾸준히 증가하고 있는 추세이다(보건복지부 2005).

유방암을 일으키는 여러 요인으로 성별, 나이, 유전자 변형, 가족력, 호르몬, 방사선 치료력, 알코올, 인종 등이 있으며, 특히, 식생활에 의한 유병률이 약 35%에 이르고 있다(Cancer Detection Section : Resources for health professionals 2010). 또한, Wang 등 (2006)은 ROS를 억제하는 항산화 체계의 불균형으로 인하여 DNA와 세포 조직의 손상으로 인하여 유방암이 발생할 수 있다고 하였다.

이러한 유방암의 예방 및 치료에 있어서 다양한 연구가 끊임없이 진행되고 있으며, 그 중 phytochemical에 의한 효과가 주목받고 있다. Phytochemical은 과일과 채소에 들어있는 화학물질로 인체 내에서 산화물질의 제거, 면역체계의 자극, 세포 증식과 세포사멸에 관련된 유전자의 조절 등에 효과가 있다(Jhons 등 1999).

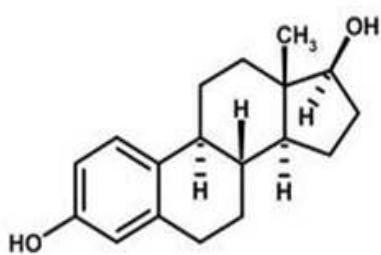
세포 사멸에는 외부 자극에 의해 수동적으로 일어나는 necrosis와 세포 내에서 능동적으로 일어나는 apoptosis가 있다. 다양한 apoptosis mechanism 중 하나로, 세포의 수용체와 관련된 외적 pathway와 미토콘드리아와 관련된 내적 pathway로 나눌 수 있다(Budihardjo 1999).

Apoptosis로 인한 세포 사멸은 미토콘드리아 막에 존재하는 Bcl-2 family(bcl-2, bax)의 유전자의 발현과 cytochrome-C의 분비 현상이 나타나게 된다. 여기에서 이러한 Bcl-2 family와 분비된 cytochrome-C를 측

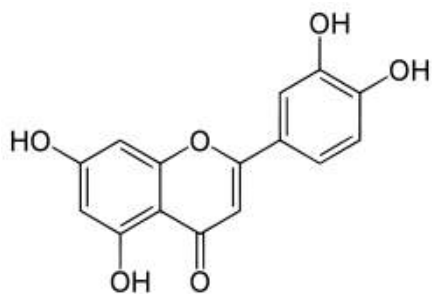
정하여 apoptosis가 일어나는 것을 확인할 수 있다.

이러한 세포 사멸을 일으키는 주체는 단백질 분해효소인 caspase (cysteine-aspartic protease or cysteine-dependent aspartate-directed protease)로 기질이 되는 단백질의 특정한 aspartic acid를 인지하여 세포 내 단백질과 핵단백질을 분해하는 역할을 한다. 이에 이러한 활성화된 caspase를 측정하는 것 또한 apoptosis가 일어난 것을 최종적으로 알 수 있는 지표가 된다(Reed 등 1997, Schuler 등 2001, Reed 등 1994).

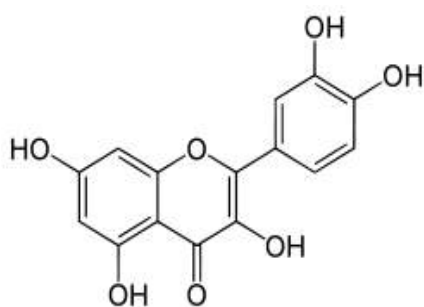
이에 본 연구의 목적은 국내외 품종별 green pepper에 있는 비타민 C, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드를 비롯하여 고추에 주로 함유된 flavonoids 인 luteolin, quercetin, apigenin의 양을 측정하고, 이들로 인한 항산화 효과와 더불어 유방암 세포에서의 apoptosis를 통한 세포 사멸 효과에 관한 연구를 수행하였다. 이에 국내산 green pepper의 flavonoids에 대한 기초 자료를 제공하고, 이들의 항산화 및 유방암에서의 apoptosis의 세포 사멸 효과를 통하여 암을 비롯한 다양한 질병의 예방에 있어 잠재적인 가치를 알아보고자 하였다.



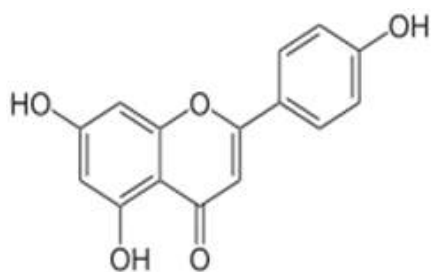
Estrone



Luteolin



Quercetin



Apigenin

Fig 1. Structures of estrogen and flavonoids

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 연구에서는 풋고추(녹광), 파리고추(노홍), 오이고추(길상), 청양고추(신홍)의 4종류(*Casicum annuum* L.)와 Jalapeno pepper(*Capsicum annuum* Jalapeno)를 사용하였다. 국내산 고추는 2011년 10월 경남 진주에서 재배한 것이며, Jalapeno pepper power는 <http://www.amazon.com>에서 구입하였다. 국내산 고추 4종은 수세 후 물기를 제거한 후, 세로로 잘라 꼭지와 씨를 제거하여 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료는 믹서기(HR-2860, Philips, Korea)로 분쇄하여 분말형태로 -80℃에 보관하면서 사용하였다. Jalapeno pepper power 역시 -80℃에서 보관하였다.

### 2. 실험 방법

#### 2.1. 메탄올 추출

동결 건조한 분말 10g에 80% 메탄올 100mL을 넣고 교반기(Shaking incubator, SI-600R, Jeio Co LTD, Korea)를 이용하여 12시간 동안 27℃에서 교반하며 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No.1)로 거른 후, 남은 잔사는 동일한 방법으로 반복 추출하여 총 300mL의 메탄올 추출물을 얻었다. 추출물은 회전 진공농축기(Rotavapor, Buchi, Germany)로 감압·농축하여 동결 건조한 후, -80℃에서 보관하였다.

## 2.2. 기능성 성분 분석

### 2.2.1. 플라보노이드 분석

배당체의 형태로 존재하고 있는 플라보노이드를 비배당체의 형태로 분석하기 위하여 Hertog 등(1992)의 방법을 참고하여 산가수분해법을 이용하였다. 동결 건조한 메탄올 추출물 50 mg을 methanol 5 mL에 녹인 후, 증류수 4.5 mL과 황산 0.5 mL을 첨가하였다. 이후 90℃에서 30분간 가열하여 산가수분해를 실시하였다. 가수분해물을 냉각 후 감압·농축하여 methanol을 제거하였다. 회수하여 증류수를 이용하여 10 mL이 되도록 정용하였다. 이 용액을 ethyl acetate 10 mL로 3회 반복 추출(용매분획)하여 얻어진 ethyl acetate 층을 농축하였다. 농축물을 methanol로 회수하여 4 mL이 되도록 정용한 후, 그 중 0.5 mL을 취하여 0.45μm membrane filter로 여과한 다음, HPLC 분석에 사용하였다. 분석조건은 Table 1과 같다.

**Table 1. Operating condition of HPLC**

Condition		
Column	ODS-80Ts, 4.6 x 250mm, Tosoh, Kyoto, Japan.	
Flow rate	1.0 mL/min	
Detection	360nm	
Mobile phase		
Time (min)	35% Methanol (containing 2% acetic acid)	70% Methanol (containing 2% acetic acid)
0	100	0
30	0	100
40	0	100



### 2.2.2. 비타민 C 함량

동결 건조한 메탄올 추출물 분말 1 g에 동량의 10% 메타인산 1 mL을 가하여 현탁시킨 후, 5% 메타인산 19 mL을 넣어 20 mL로 정용하였다. 이를 1분간 잘 혼합하고 20분간 방치한 후 1000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 취해 HPLC용 0.2 $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석시료로 사용하였다. 컬럼은  $\mu$ -bondapack C18을 사용하였으며, 이동상은 0.05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : acetonitrile (60 : 40)을 흘려주었다. Flow rate 은 1.0 mL/min이었으며, 시료는 10  $\mu$ L 주입하여 254nm 파장에서 측정하였다. 표준물질은 L-ascorbic acid를 사용하여 500~2000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 용해시켜 분석하였으며, 비타민 C 함량은 건조중량 100g 당 mg 함량으로 나타내었다.

### 2.2.3. 총 폴리페놀 함량

Folin-Ciocalteu 방법(Singleton 등 1965)을 이용하여 총 폴리페놀 함량을 분석하였다. 메탄올 추출물을 1 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 시료 40  $\mu$ L에 증류수 200  $\mu$ L를 가한 다음, 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent(Sigma Chemical Co., USA) 200 $\mu$ L 을 넣은 후 교반하였다. 이 용액에 포화 30%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  600  $\mu$ L와 증류수 160  $\mu$ L를 가한 후 2시간동안 상온에서 반응시켜 분광광도계(DU 530 spectrophotometer, Bekman, USA)를 이용하여 765nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid(Sigma Chemical Co., USA)를 표준물질로 사용하였으며, 0~500  $\mu\text{g/mL}$ 농도로 녹여 표준 검량 곡선을 작성하였고, 총 폴리페놀 함량은 1g 건조중량에 대한 mg gallic acid equivalents(GAE)로 환산하여 표시하였다.

### 2.2.2. 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Meda A 등(2005)의 연구를 참고하여 Dowd법으로 측정하였다. 메탄올 추출물을 1 mg/mL 농도로 녹인 시료 700  $\mu$ L에 2% NaNO<sub>2</sub> 700  $\mu$ L를 가하여 10분간 실온에 방치하고 분광광도계(DU 530 spectrophotometer, Bekman, USA)로 415nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 건조중량 1g에 대한 mg quercetin equivalents(QE)로 환산하여 표시하였다.

## 2.3. 항산화 활성 측정

항산화 활성은 메탄올 추출물을 이용하여 측정하였으며, 실험에서는 DMSO(Dimethyl Sulfoxide)에 녹여서 사용하였다.

### 2.3.1. DPPH 자유기 소거 활성능

산화적 스트레스의 원인이 되는 유리 라디칼의 소거 활성을 측정하기 위하여 DPPH( $\alpha, \alpha$ -diphenyl-picrylhydrazyl)를 사용하였다. 농도별 (200, 400, 600, 800  $\mu$ g/mL)로 희석한 추출물 80 $\mu$ L에 0.2mM DPPH 용액 320  $\mu$ L를 가하여 37 $^{\circ}$ C의 암실에서 30분간 반응시켰다. 그 후 분광광도계를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식에 대입하여 DPPH 자유기 소거 활성능을 계산하였다. 또한 양성 대조군으로 L-ascorbic acid를 사용하여 0~250  $\mu$ g/mL범위에서 표준검량곡선을 작성한 후, L-ascorbic acid의 활성에 대비하여 상대적인 항산화력을 알아보았다. 항산화력은 Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg VCEAC/g, dry basis)로 환산하여 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 비첨가구의 흡광도

### 2.3.2. ABTS 자유기 소거 활성능

ABTS(2,2'-azobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) 자유기 소거 활성능은 Van den Berg 등(2000)의 방법을 참고하여 측정하였다. PBS(100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4)에 녹인 1.0 mM AAPH(2,2'-azobis(2-methylpropion-amidine)dichloride)와 2.5 mM ABTS를 1:1로 섞어 68℃ 항온수조에서 1시간 정도 반응시켜 ABTS 자유기를 생성하였다. 이 용액의 흡광도가 0.70±0.02가 되도록 분광광도계를 이용하여 734 nm 파장에서 흡광도를 측정하여, PBS로 희석하거나 항온수조에서 반응시켜주었다. 농도별로 희석한 추출물 20 µL에 ABTS 용액 980 µL을 넣어 37℃ 항온수조에서 10분간 반응시킨 후, 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 다음의 식에 대입하여 ABTS 자유기 소거 활성능을 계산하였다. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg VCEAC/g, dry basis)는 DPPH 자유기 소거 활성능에서와 동일한 방법으로 환산하여 나타내었다.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = (1 - \frac{A}{B}) \times 100$$

A : 추출물 첨가구의 흡광도

B : 추출물 비첨가구의 흡광도

## 2.4. 고추추출물의 세포사멸 효과 측정

### 2.4.1. 유방암 세포의 증식 억제 효과

고추 추출물의 세포 사멸 효과를 측정하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. MTT assay는 살아있는 세포에 MTT 시약을 처리하였을 때, mitochondrial dehydrogenase에 의해 환원되어 tetrazolium salt의 cleavage로 형성된 보라색 formazan을 생성하게 되는데, 이를 측정하여 상대적인 세포의 생존율을 측정하는 방법이다. 적절히 배양된 유방암 세포(MCF-7, MDA-MB-231)를  $1 \times 10^5$  cells/mL 농도로 96 well plate에 분주한 다음, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거한 후, 추출물을 농도별로 (200, 400, 600, 800 µg/mL) 처리하였다. 추출물은 DMSO에 녹여서 사용하였으며, 200배 농도로 만든 후, 배지에 희석하여 DMSO가 최종 농도의 0.5%에 해당하도록 하였다. 이 후, 72시간 배양한 다음 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 10 µL/well 분주하고 다시 4시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 100 µL 씩 넣었다. 보라색 formazan이 잘 녹도록 37°C 인큐베이터에 20분간 보관한 후, shaking하여 ELISA microplate reader(Bio-rad, Benchmark, USA)의 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 0.5% DMSO가 포함된 배지만 처리하였으며 결과는 대조군의 흡광도를 100으로 하여 %로 나타내었다.

### 2.4.2. Necrosis 측정

Necrosis로 인한 세포 사멸이 이루어지면, 세포에서 medium으로 lactate dehydrogenase (LDH)를 분비하게 되는데, 이는 plasma membrane

integrity의 감소를 나타낸다. 분비된 LDH를 측정하기 위하여 LDH cytotoxicity assay kit (Cayman Chemical Company, U.S.A.)를 사용하였다. Cell을  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주한 후, 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 제거한 후, 추출물을 400  $\mu\text{g/mL}$ , 800  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였다. 24시간 배양 후, 배지 상층액 100  $\mu\text{L}$ 와  $\text{NAD}^+$ , lactic acid, INT, LDH diaphorase가 포함된 LDH reaction solution 100  $\mu\text{L}$ 를 섞어 실온에서 30분간 shaking 해준 뒤 490nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard로 표준곡선을 작성한 후 대입하여, 추출물을 처리하지 않은 대조군에 대해 분비된 LDH의 양을 100으로 하여 %로 나타내었다.

### 2.4.3. Apoptosis 측정

#### 2.4.3.1. Bax, cleaved caspase-3, PARP 측정

$1 \times 10^5$ 의 세포에 시료를 400  $\mu\text{g/mL}$ , 800  $\mu\text{g/mL}$  농도로 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ 의  $\text{CO}_2$  배양기 내에서 24시간 동안 배양한 후, 수집하여 PBS로 세척하여 200  $\mu\text{L}$ 의 용해 버퍼(lysis buffer)를 첨가하여 잘 혼합하여, 얼음에서 30분간 방치하였다. 세포질 용액(cytoplasmic extract)을 만든 후, 15% SDS-polyacrylamide gel 상에서 protein의 양을 10  $\mu\text{g/lane}$ 으로 하여 전기 영동했다. 전기 영동된 gel을 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로 옮긴 후, 차단용액 (5% skim milk in TBS-T:trypsin buffered saline, 1% Tween-20)에 담가 상온에서 1시간 이상 반응시킨 후, 일차항체인 Bax (Cell Singnaling Technology, USA), cleaved caspase-3 (Santa Cruz Biohechnology, USA), PARP (Cell Singnaling Technology, USA)를 1:1000으로 희석하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight으로 반응 시켰다. 이 후 세척과정을 거쳐 이차항체를 이용하여 2시간 동안 반응을 시킨 후, 이입된 단백질을

발현을 정량하기 위하여 동량의 단백질로  $\beta$ -actin에 대한 western blot을 시행하였다. ECL 용액(Amersham Pharmacia Co., USA)으로 반응시킨 후 X-ray film으로 노출시켜 단백질 변화량을 확인하였다.

### 3.1. 통계처리

평가 결과의 통계처리는 IBM SPSS Statistics 19 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 유의적인 차이가 있을 경우 Duncan의 다중범위 시험법(Duncan's multiple range test)으로 통계적 유의성을 검증하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 추출 및 수율

##### 1.1. 항산화 및 항암효과 분석용 추출

Green pepper의 항산화 및 항암효과를 측정하기 위하여 80% methanol로 추출한 수율은 Table 2와 같다. 각 추출물의 수율은 80% methanol로 추출한 것을 동결 건조하여 분말 대비 건조물의 중량 백분율로 계산하여 나타내었다.

5 품종의 추출 수율은 오이고추가 39.44%로 가장 높았으며, 풋고추 36.60%, 할라피뇨 35.66%, 파리고추 34.03%, 청양고추가 33.56%의 순으로 청양고추가 가장 적은 추출 수율을 갖고 있었다.

**Table 2. Yield(%) of 80% methanol extracts of green pepper cultivars**

Variety	Methanol extract yield (%)
PP <sup>1)</sup>	36.60
CP	33.56
KP	34.03
OP	39.44
JP	35.66

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper



## 2. 기능성 성분 분석

### 2.1. 플라보노이드 분석

Flavonoids는 식물에서 자연적으로 발견되는 polyphenol antioxidants로써 plant nutrients라고도 불리는데, 이는 인체에 있어서 잠재적으로 유용하고, non-toxic하기 때문이다.

최근 연구에 따르면 flavonoids는 암, 심장질환 및 노화와 관련된 질병의 위험성을 감소시켜 주는 것으로 나타났다. 또 다른 연구에서는 flavonoids가 치아 부식 예방과, 감기와 같은 일반적인 질병의 발병을 감소시키는데 도움을 준다고 하였다. 이러한 효과로 인하여 최근 소비자와 식품 산업에서 특히 더 주목받고 있다(Keller 등, 2009).

Hertog(1992) 등의 연구를 참고하여 고추에 함유된 주요 flavonoids로써 luteolin, quercetin, apigenin을 분석 대상으로 선정하였다.

Luteolin, quercetin, apigenin을 표준물질 500 µg/mL 농도로 처리하여 얻은 HPLC 결과는 Fig 1, Fig 2, Fig 3과 같다. 이러한 flavonoids 표준품을 기준으로 고추추출물의 20.85분, 22.85분과 27.23분에 용출되는 피크들이 각각 quercetin, luteolin, apigenin임을 확인 할 수 있었다. 이에 고추추출물에서 검출된 flavonoids들의 함량을 각각 표준곡선에 준해 계산한 결과는 Table 3과 같다. Luteolin, quercetin 및 apigenin의 세 가지 flavonoids 중에서 luteolin의 함량이 가장 높았으며, quercetin, apigenin의 순서로 함유되어 있었다. 5가지 품종별 flavonoids 함량을 비교하면, 파리고추에서 3개의 flavonoids 모두 유의적으로 가장 높은 값을 갖고 있었다.

김 (2010)과 Lee 등(1995), Hertog 등(1992)의 green pepper의 flavonoids 분석 결과를 보면 함량에 있어서 약간의 차이를 나타내고 있다. 이는 고추 개체 간, 시료의 성숙도, 재배 시기 등에 의한 영향을 받은 것으로 사료된다(김, 2010).

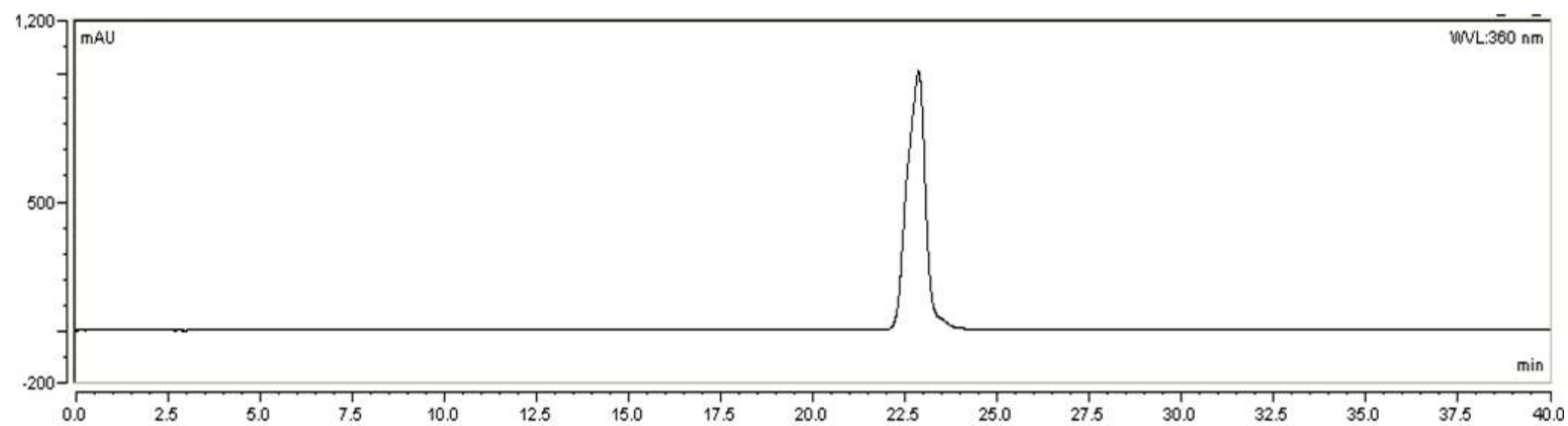


Fig. 2. HPLC profile of luteolin standard, UV detection at 360nm

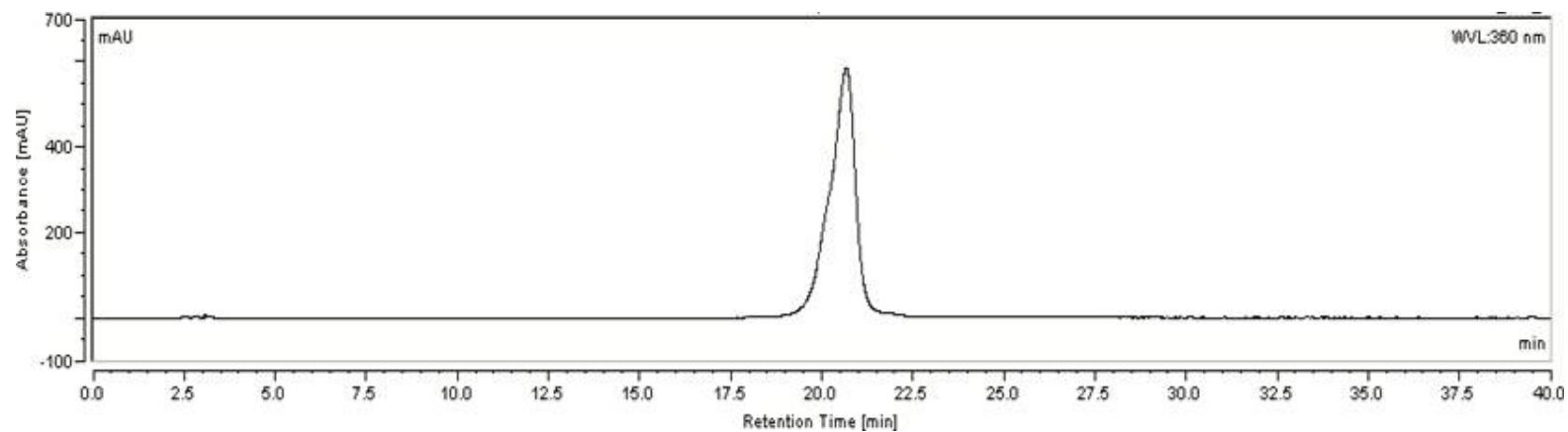


Fig. 3. HPLC profile of quercetin standard, UV detection at 360nm

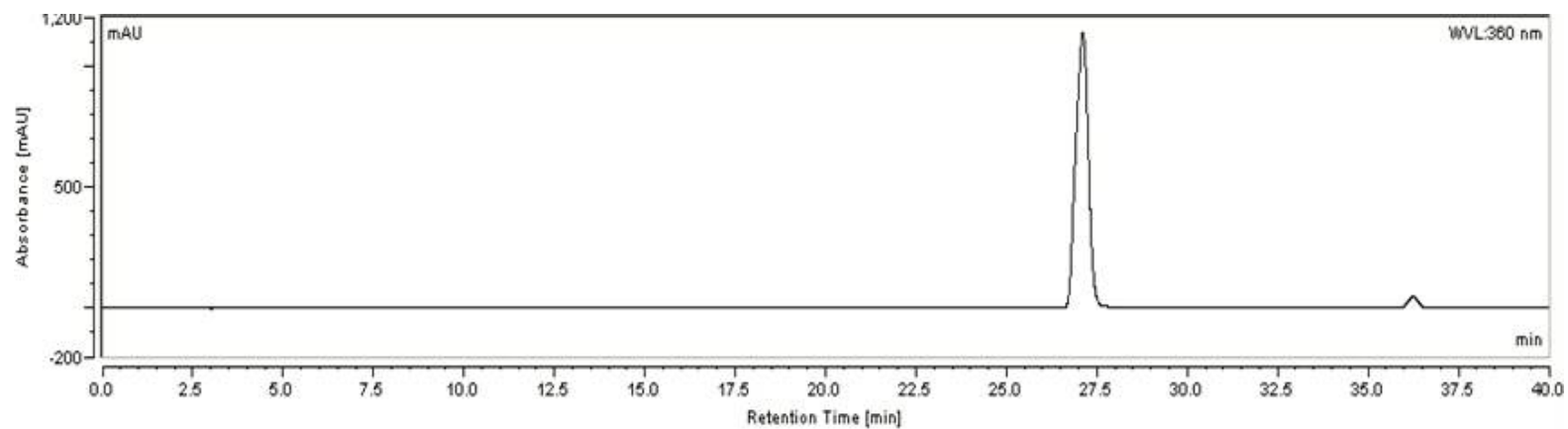


Fig. 4. HPLC profile of apigenin standard, UV detection at 360nm

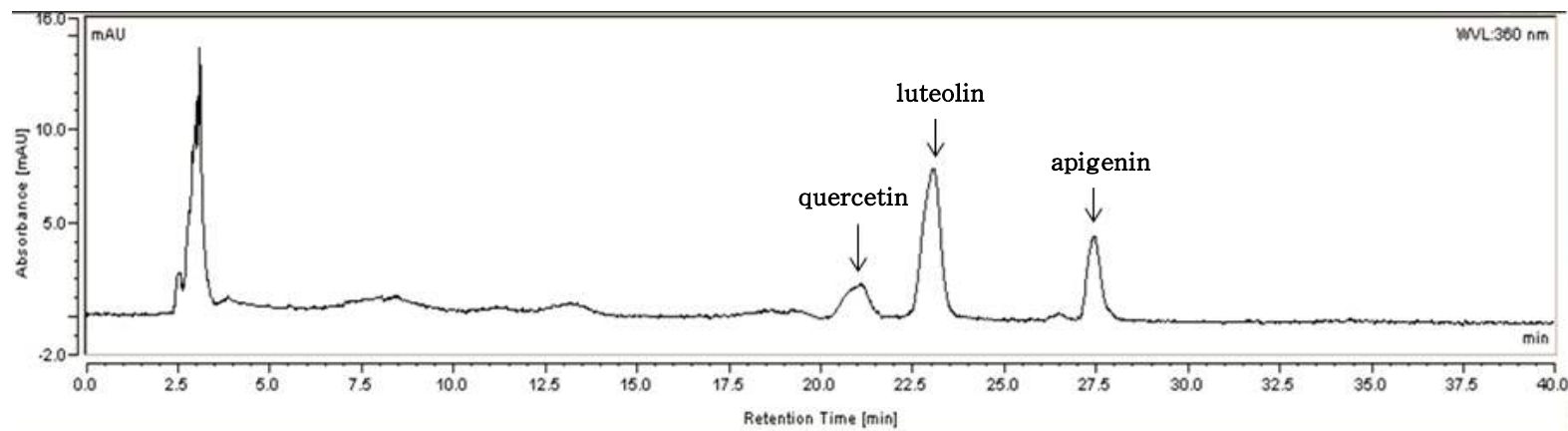


Fig. 5. HPLC profile of Phut pepper, UV detection at 360nm

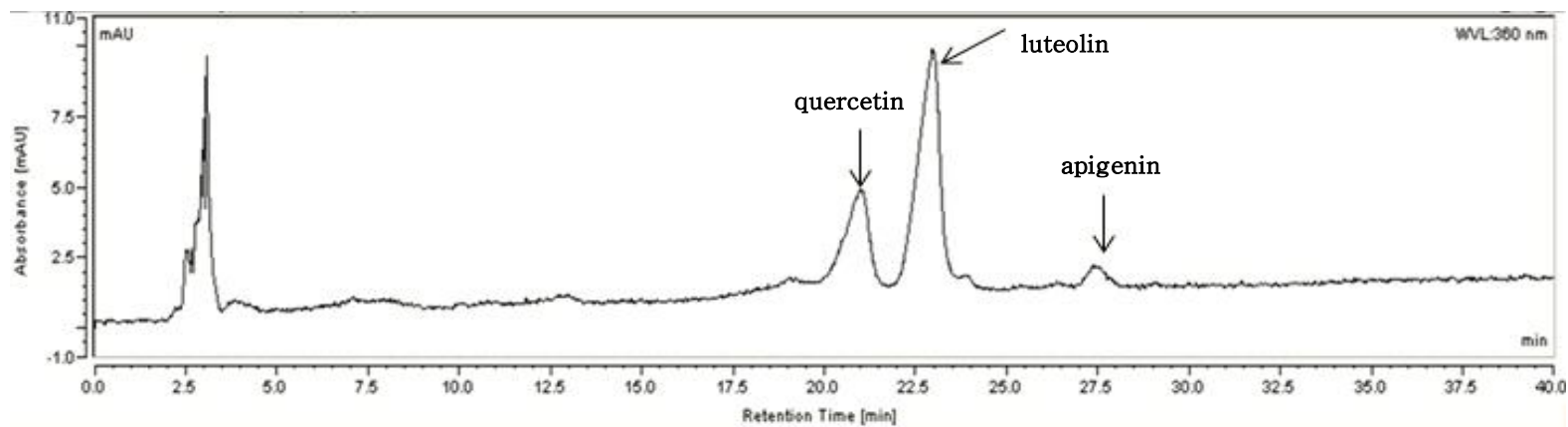


Fig. 6. HPLC profile of Cheonyang pepper, UV detection at 360nm

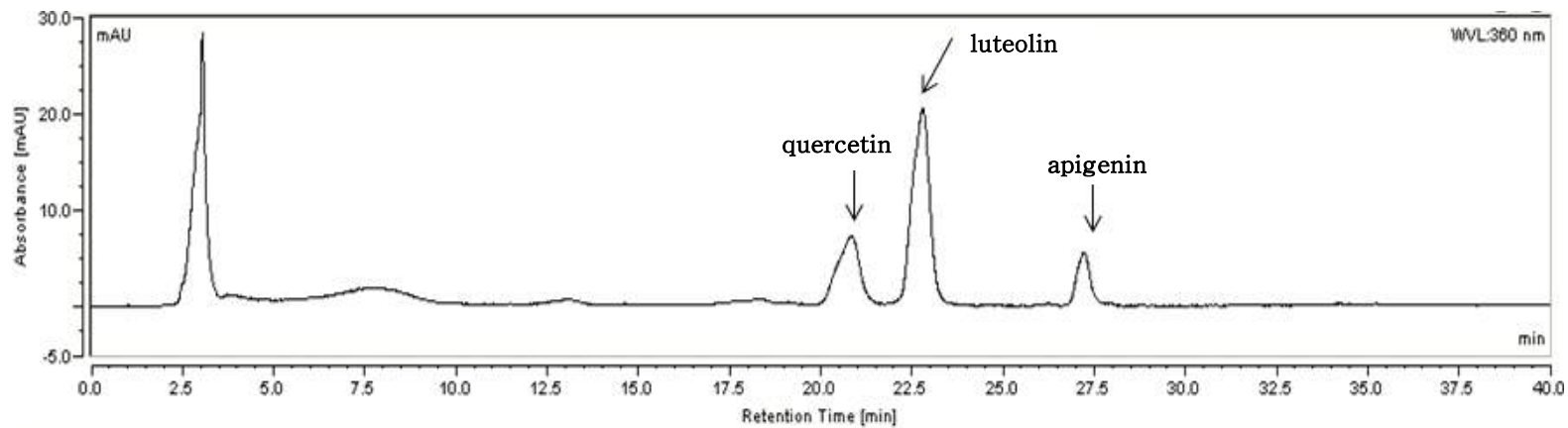


Fig. 7. HPLC profile of Kkuari pepper, UV detection at 360nm

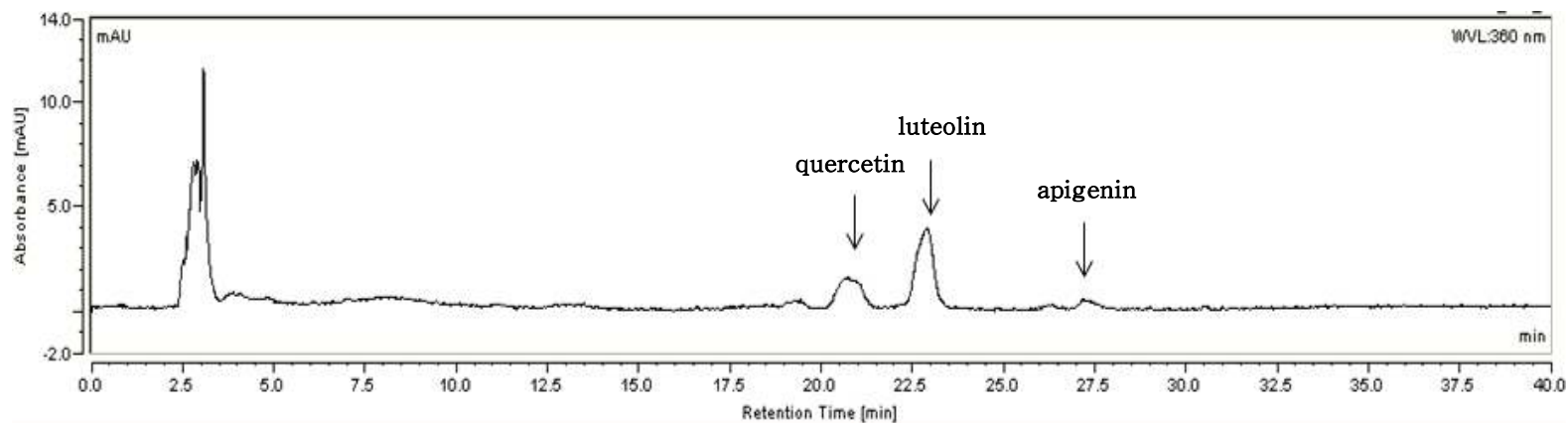


Fig. 8. HPLC profile of Ohi pepper, UV detection at 360nm



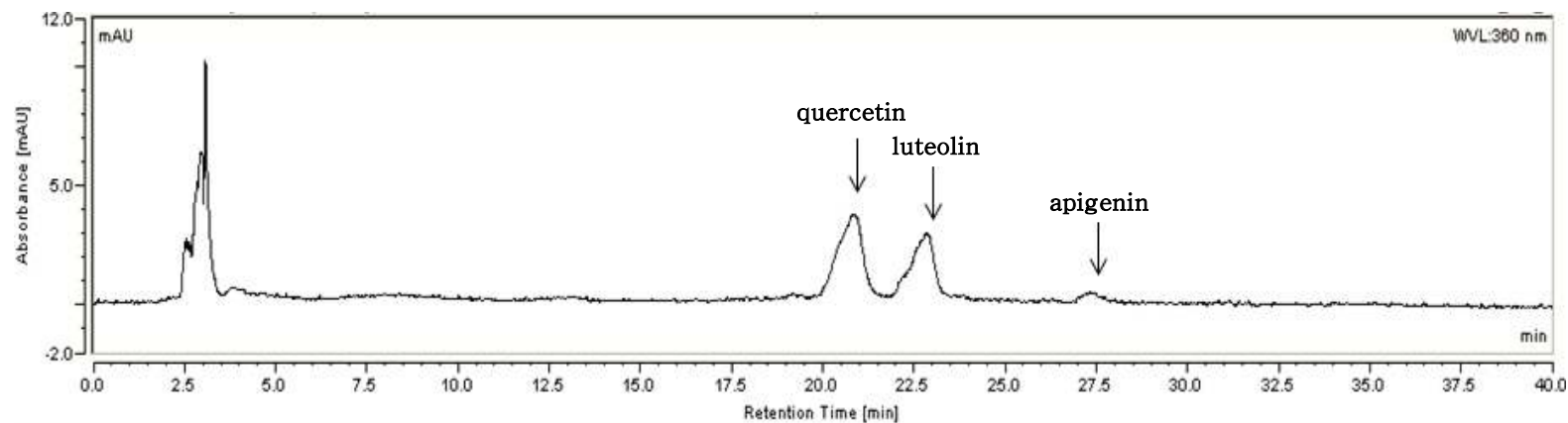


Fig. 9. HPLC profile of Jalapeno, UV detection at 360nm

**Table 3. Flavonoid contents in green pepper cultivars**

( unit : mg/g dry basis)

Variety	Flavonoids		
	Luteolin	Quercetin	Apigenin
PP <sup>1)</sup>	0.39 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>
CP	0.46 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>c</sup>
KP	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
OP	0.31 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>d</sup>
JP	0.34 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>d</sup>

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> a,b,c,d : Different superscripts within columns are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test

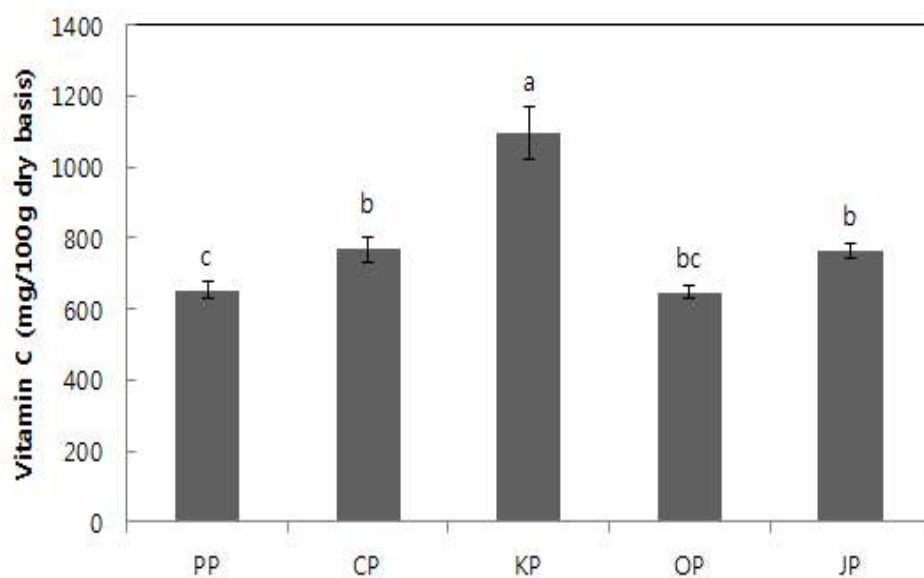
## 2.2. 비타민 C

대표적인 항산화물질인 비타민 C는 세포에 독성을 나타내지 않고 암 예방 효과를 주는 영양소로 인체 내에서 생성되는 자유 라디칼의 위험을 감소시킨다(Yoo 등 2004).

고추는 가장 높은 비타민 C를 함유하고 있는 채소 중 하나로 알려져 왔다(Cho 등 2010). 고추의 비타민 C는 생고추에 46~243 mg/100g이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Mozafar 1994). Sviribeley 등(1933)이 보고한 바에 따르면, 고추의 비타민 C는 오렌지의 6배 높다고 하였다.

본 연구에서는 메탄올 추출 전·후의 비타민 C 함량의 변화를 살펴보기 위하여, 생고추와 메탄올 추출물의 비타민 C를 각각 측정하였다. 먼저 생고추의 경우, 건조 중량 100 g 당 1000~2100 mg 정도의 비타민 C를 함유하고 있다. 파리고추가 1095 mg으로 가장 높은 비타민 C를 함유하고 있었으며, 오이고추가 647 mg으로 가장 적은 비타민 C를 함유하고 있음을 확인하였다(Fig 10). 이에 추출과정을 거치면서 약 50% 정도의 비타민 C의 손실이 발생하는 것을 확인할 수 있다. 이는 비타민 C가 pH, 온도, 빛, 효소의 유무, 산소, 금속 이온의 유무 등에 따라서 쉽게 파괴되는 성질을 갖고 있기 때문인 것으로 사료된다(Moser 등 1991).

비타민 C는 품종, 성숙도, 수확 후 취급방법, 분석방법 등에 따라 함량의 차이가 나타나는 것으로 알려져 있다(Mozafar 1994). 또한 Markus 등(1999)은 고추 수확시기에 따라 비타민 C 함량의 차이를 보고하였다. 이는 비타민 C가 수용성 비타민으로 수분감소 일조시간 등 여러 환경 요인에 의해 쉽게 파괴되는 성질에서 기인된 것으로 판단되고 있다(Cho 등 2010). 실험에서 사용한 고추는 온실재배를 하였더라도, 여름에 비해 비교적 일조량이 적은 11월에 재배된 것이므로, 이에 대한 영향을 받았을 것으로 보인다.



**Fig. 10. Contents of vitamin C in green pepper extracts**

Results are shown as mean±SD

PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

a,b,c,d : Different superscripts within columns are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

## 2.3. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포하며 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 이들은 항산화, 항암, 및 심장질환예방 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Serafini 등 2006, Stoner 등 1995, Vijaya 등 1995, Hattori 등 1990).

5가지 품종의 green pepper에 함유된 폴리페놀의 양을 gallic acid의 양으로 환산하여 표시한 결과(Table 4), 할라피뇨에서  $13.39 \pm 1.71$  mg gallic acid/g(dry basis)로 가장 높게 측정되었으며 다음으로 파리고추가  $13.29 \pm 0.45$  mg gallic acid/g dry basis로 측정되었으나, 5가지 품종간의 유의적이 차이는 나타나지 않았다.

플라보노이드는 diphenylpropanes(C6-C3-C6)의 골격구조로 되어있으며, 야채류, 과일류, 종실류 등 식물계에 널리 분포되어 있다(Hertog 1992, Kuhnau 1976). 자연에 존재하는 천연 항산화제로 작용할 수 있는 총 플라보노이드 함량을 살펴보면(Table 4), 파리고추가  $7.02 \pm 0.13$  mg quercetin/g(dry basis)으로 유의적으로 가장 높게 측정되었고, 할라피뇨가  $1.57 \pm 0.01$  mg quercetin/g(dry basis)로 가장 적게 측정되었다. 할라피뇨가 총 페놀의 함량은 가장 높았던 반면, 총 플라보노이드 함량이 가장 적은 것으로 보아 할라피뇨 안의 페놀 성분 중에 플라보노이드를 제외한 다른 페놀의 함량이 많을 것으로 보인다. 이러한 결과는 Howard 등 (1995)의 연구결과에서도 비슷한데, 12 품종의 capsicum annum을 측정한 결과, 할라피뇨의 모든 품종에서 가장 적은 플라보노이드를 함유하고 있었다.

Chun 등(2005)은 30종 이상의 과일과 채소의 총 페놀과 플라보노이드 함량을 측정한 결과, asparagus가  $64.15 \pm 2.46$ mg gallic acid/100g fresh matter, bell pepper가  $52.49 \pm 1.07$  mg gallic acid/100g fresh matter의 총 폴리페놀 함량을 갖고 있었다. 총 페놀 함량은 그 식품의 총 항산화력에 기여하는 바가 매우 높은 것으로 보고되었는데(Winston, 1991), 이 점을

고려한다면, green pepper의 총 항산화력이 높을 것으로 사료되며, 이에 고추 추출물의 생리활성에 대한 효과가 기대된다.

**Table 4. Contents of total polyphenols and total flavonoids in green pepper cultivars**

(unit : mg/g dry basis)

Variety	Total polyphenols (Gallic acid mg/g)	Total flavonoids (Quercetin mg/g)
PP <sup>1)</sup>	13.19±0.39	3.04±0.09 <sup>d2)</sup>
CP	12.61±0.43	4.25±0.11 <sup>c</sup>
KP	13.29±0.45	7.02±0.13 <sup>a</sup>
OP	12.40±0.62	4.65±0.02 <sup>b</sup>
JP	13.39±1.71	1.57±0.01 <sup>e</sup>

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> Different superscripts within columns are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

### 3. 항산화 활성 측정

#### 3.1 DPPH 자유기 소거 활성능

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유기 소거 활성능 측정은 항산화 활성 측정에서 많이 사용되는 방법이다. DPPH<sup>•</sup>는 안정되고 상업적으로 이용 가능한 유기 질소 라디칼 중 하나이다(MacDonald 등 2006). 항산화효과는 시료에서 DPPH<sup>•</sup>의 소거되는 비율을 측정한다. DPPH<sup>•</sup>를 측정하는 방법은 여러 가지가 있으나, 가장 많이 사용되는 것은 UV spectrometer이다. DPPH<sup>•</sup>는 517nm(보라색)에서 최대의 흡광도를 가진다. 항산화제로부터 수소를 흡수하여 DPPH를 형성하게 되고, 보라색에서 노란색으로 변하게 된다. 이에 결과적으로, 517nm에서의 UV 흡광도가 감소하는 것을 통하여 항산화력을 측정하는 방법이다.

Green pepper 추출물의 DPPH 자유기 소거 활성능을 측정한 결과, 농도에 따라 통계적으로 유의적인 효과를 보였다(Table 5). 품종별로 살펴보면, 5가지 품종 중에서 파리고추의 소거 활성능이 모든 농도에서 가장 높은 결과를 나타내었다.

Bor 등(2006)의 연구에서 200 mg/mL 농도에서 양파가 4%의 소거활성을 보이며, 높은 항산화 및 항암능을 갖고 있는 것으로 알려진 버섯은 8%의 전자공여활성을 나타내었다. 같은 농도에서 파리고추 역시 약 8%의 소거활성을 갖고 있는 것과 비교하면, 파리고추의 항산화 효과가 우수하다는 것을 확인 할 수 있다.



Table 5. DPPH radical scavenging activity of methanol extract from various green peppers

(unit : %)

Variety	DPPH radical scavenging activity				
	200 $\mu\text{g/mL}$	400 $\mu\text{g/mL}$	600 $\mu\text{g/mL}$	800 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
PP <sup>1)</sup>	2.45 $\pm$ 0.89 <sup>b</sup>	5.56 $\pm$ 1.04 <sup>c</sup>	8.32 $\pm$ 0.89 <sup>d</sup>	11.83 $\pm$ 1.01 <sup>c</sup>	17.13 $\pm$ 1.02 <sup>c</sup>
CP	6.25 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	10.04 $\pm$ 1.20 <sup>b</sup>	13.42 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>	17.17 $\pm$ 1.59 <sup>b</sup>	22.29 $\pm$ 1.91 <sup>b</sup>
KP	7.99 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	17.17 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	23.72 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	32.33 $\pm$ 2.47 <sup>a</sup>	40.85 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>
OP	1.39 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>	4.88 $\pm$ 0.88 <sup>c</sup>	7.71 $\pm$ 1.23 <sup>d</sup>	10.93 $\pm$ 0.62 <sup>c</sup>	15.77 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>
JP	6.51 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	10.84 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	16.36 $\pm$ 2.34 <sup>b</sup>	18.07 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	21.98 $\pm$ 1.27 <sup>b</sup>

Results are shown as mean $\pm$ SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> Different superscripts within columns are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

### 3.2. ABTS 자유기 소거 활성능

ABTS (2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)) assay 는 수용성 및 지용성 물질의 항산화 측정에 모두 적용할 수 있기 때문에 식품의 항산화 활성을 측정하는데 널리 사용되고 있다(MacDonald 등 2006). 734nm에서 최대의 흡광도를 가지는 ABTS와 시료를 반응시켜 나타나는 색변화를 측정하여 radical cation의 감소를 확인한다(Biglari 등 2008).

Green pepper 추출물의 ABTS 자유기 소거 활성능을 측정한 결과는 Table 6과 같다. DPPH 라디칼 소거능에서와 마찬가지로, 파리고추가 5가지 품종 중에서 유의적으로 가장 높은 활성을 갖고 있었다.

VCEAC(vitamin C equivalent antioxidant activity) 환산 값을 이용한 항산화력 공여도 측정 방법은 ABTS 자유기의 색변화로 추출물의 항산화력을 측정할 수 있는 간단한 방법이다(김 등 2002). 비타민 C는 과일과 채소에 많이 함유되어 있으며, 이를 기준물질로써 나타내어 시료 간 항산화력을 비교하는 것은 매우 편리한 방법으로 사료된다. 그러나 Yoo 등 (2004)은 비타민 C가 수용성으로 극성 용매에 용해된다는 것을 고려하여 ABTS 자유기 소거 활성능 뿐 아니라 DPPH 자유기 소거 활성능도 이같은 비타민 C를 기준으로 표현하는 것이 바람직하다고 하였다. 이에 ABTS 자유기 소거 활성능과 더불어 DPPH 자유기 소거 활성능을 비타민 C에 대비하여 VCEAC로 계산한 결과는 Table 7과 같다.

Table 6. ABTS radical scavenging activity of methanol extract from various green peppers

(unit : %)

Variety	ABTS radical scavenging activity		
	250 µg/mL	500 µg/mL	1000 µg/mL
PP <sup>1)</sup>	3.67±1.04 <sup>abc</sup>	7.51±1.22 <sup>b</sup>	18.15±0.59 <sup>b</sup>
CP	4.87±1.06 <sup>a</sup>	8.11±1.36 <sup>b</sup>	17.36±0.73 <sup>b</sup>
KP	4.50±0.16 <sup>ab</sup>	11.39±1.51 <sup>a</sup>	20.37±0.80 <sup>a</sup>
OP	2.96±0.82 <sup>c</sup>	5.18±0.36 <sup>c</sup>	10.98±0.83 <sup>d</sup>
JP	3.23±0.41 <sup>bc</sup>	7.60±1.03 <sup>b</sup>	14.45±2.12 <sup>c</sup>

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> Different superscripts within columns are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test

Table 7. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (mg VCEAC/g, dry basis) of methanol extract from various green peppers

Variety	Antioxidant capacity	
	DPPH radical	ABTS radical
PP <sup>1)</sup>	3.72±0.21 <sup>c</sup>	27.50±0.95 <sup>a</sup>
CP	4.40±0.37 <sup>b</sup>	24.03±1.10 <sup>b</sup>
KP	8.07±0.19 <sup>a</sup>	28.96±1.22 <sup>a</sup>
OP	3.70±0.34 <sup>c</sup>	16.93±1.47 <sup>b</sup>
JP	4.61±0.26 <sup>b</sup>	20.89±3.37 <sup>b</sup>

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> Different superscripts within columns are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test

### 3.3. Green pepper의 기능성 성분과 항산화 활성 간의 상관관계

Pearson's correlation analysis를 실시하여 green pepper의 기능성 성분들과 자유기 소거 활성간의 상관관계를 측정하였다(Table 8). DPPH 라디칼 소거활성과 luteolin, quercetin, apigenin의 상관계수는  $r=0.889$ ,  $r=0.977$ ,  $r=0.609$ 으로 양의 상관관계를 나타내었다. 특히, DPPH와 quercetin은 가장 높은 상관성을 갖고 있었다. Hanasaki 등(1994)의 연구에서 플라보노이드와 항산화 활성과의 상관관계를 비교한 결과, 플라보노이드와 자유기 소거 활성으로 인한 항산화 활성이 높은 관련이 있다는 연구 결과와 일치하였다.

이러한 결과를 통하여 플라보노이드 함량과 항산화성의 상관관계가 크다는 것을 알 수 있고, 이에 따라 green pepper에 함유되어 있는 플라보노이드 성분으로 인한 항산화 작용 효과를 짐작할 수 있다.

**Table 8. Correlation coefficients between the contents of functional substances and antioxidant effects by DPPH, ABTS assay from green pepper extracts**

	Luteolin	Quercetin	Apigenin	Vitamin C	Total Polyphenol	Total flavonoid	DPPH	ABTS
Luteolin								
Quercetin	0.917*							
Apigenin	0.511	0.529						
Vitamin C	0.891*	0.993**	0.559					
Total polyphenol	0.293	0.413	0.928*	0.435				
Total flavonoid	0.816	0.698	0.088	0.698	-0.217			
DPPH	0.889*	0.977**	0.609	0.994*	0.461	0.712		
ABTS	0.773	0.610	0.718	0.560	0.591	0.335	0.562	

## 4. 고추추출물의 세포사멸 효과 측정

### 4.1. 유방암 세포의 증식 억제 효과

Green pepper 추출물의 세포 증식 억제 효과를 측정하기 위하여 유방암 세포로서 MCF-7과 MDA-MB-231 세포를 사용하였다. 유방암의 약 60%는 estrogen receptor (ER) positive이며, 특정 단백질(ER)을 타겟으로 하는 anti-estrogen 치료로서, 더 좋은 예후를 갖고 있다. 그러나, ER-negative한 유방암은 더 공격성이 강하며 anti-estrogens 치료에 있어서 큰 효과를 갖고 있지 않다(Levy 등 1985, Lerner 등 1990, Rochefort 등 1987). 이에 항암치료제로서의 물질의 억제 효과를 측정할 때, ER-positive와 ER-negative한 세포에서 모두 효과를 나타내는지 확인 할 필요가 있다.

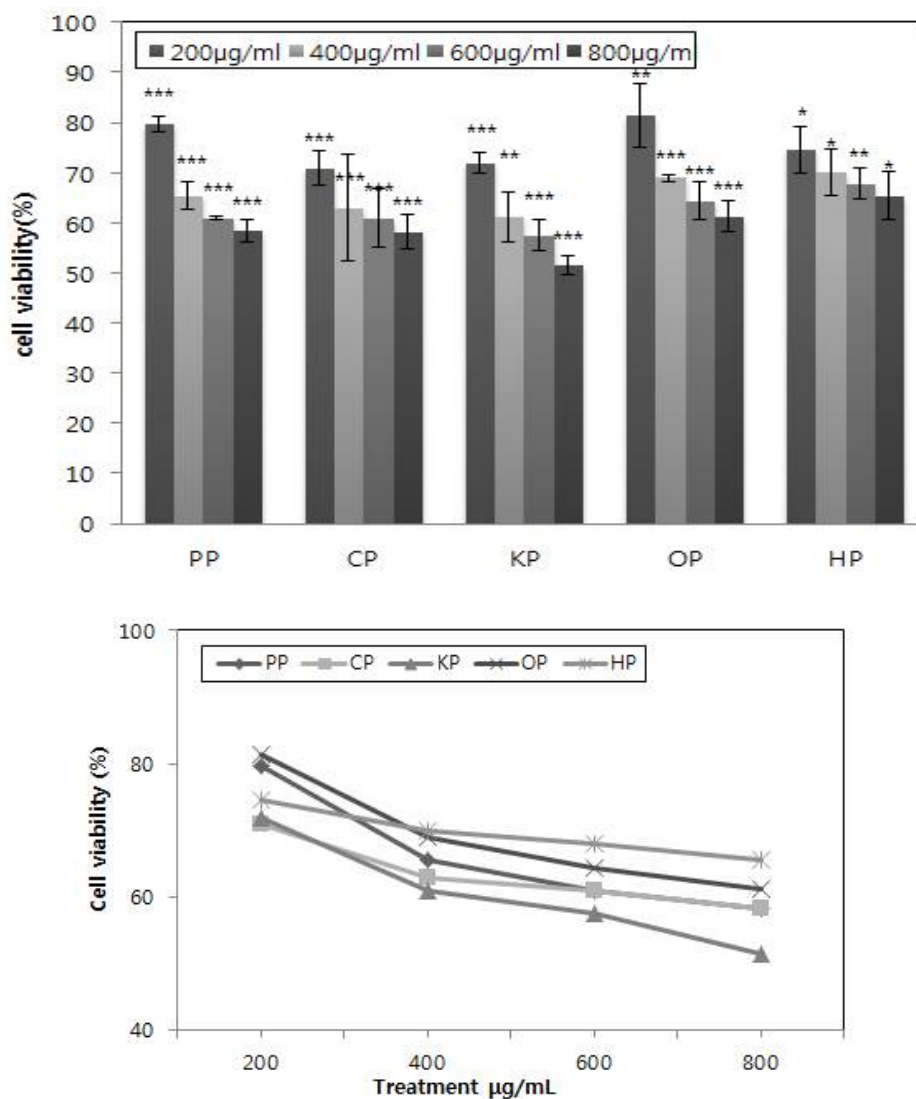
MCF-7과 MDA-MB-231 세포는 human breast cancer cell로써, 차이점으로는 크게 hormone dependent의 유무를 볼 수 있다. MCF-7은 estrogen receptor positive, MDA-MB-231은 estrogen receptor negative한 특징을 갖고 있다. 또한 MCF-7은 breast adenocarcinoma, MDA-MB-231은 medullary carcinoma로 malignant tumor cell로써, MCF-7보다 더 높은 grade를 갖고 있다고 할 수 있다(Sheikh 등 1995).

MCF-7, MDA-MB-231 세포에 200~800 µg/mL 농도로 green pepper 추출물을 처리하여 72시간 동안 배양하여 억제효과를 측정한 결과는 Fig 10, Fig 11과 같다. 두 세포에서 모두 농도 의존적으로 세포 증식 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있다. 기능성 성분과 함께 라디칼 소거 활성능이 가장 좋았던 파리고추 추출물이 암세포의 성장 저해능 또한 가장 높았다.

이에 호르몬의 의존성과 상관없이 유방암 세포에서 green pepper 추출물이 암세포의 성장 억제능을 갖고 있다고 사료된다.

Green pepper 추출물의 유방암 세포 성장 억제효과를  $IC_{50}$  값으로 계산한 결과를 살펴보면(Table 8), 파리고추 추출물의  $IC_{50}$  값이 MCF-7 세포에서 826.07  $\mu\text{g/mL}$ , MDA-MB-231 세포에서 719.58  $\mu\text{g/mL}$ 로 다른 품종에 비해 암세포 증식 억제효과가 우수함을 알 수 있었다.



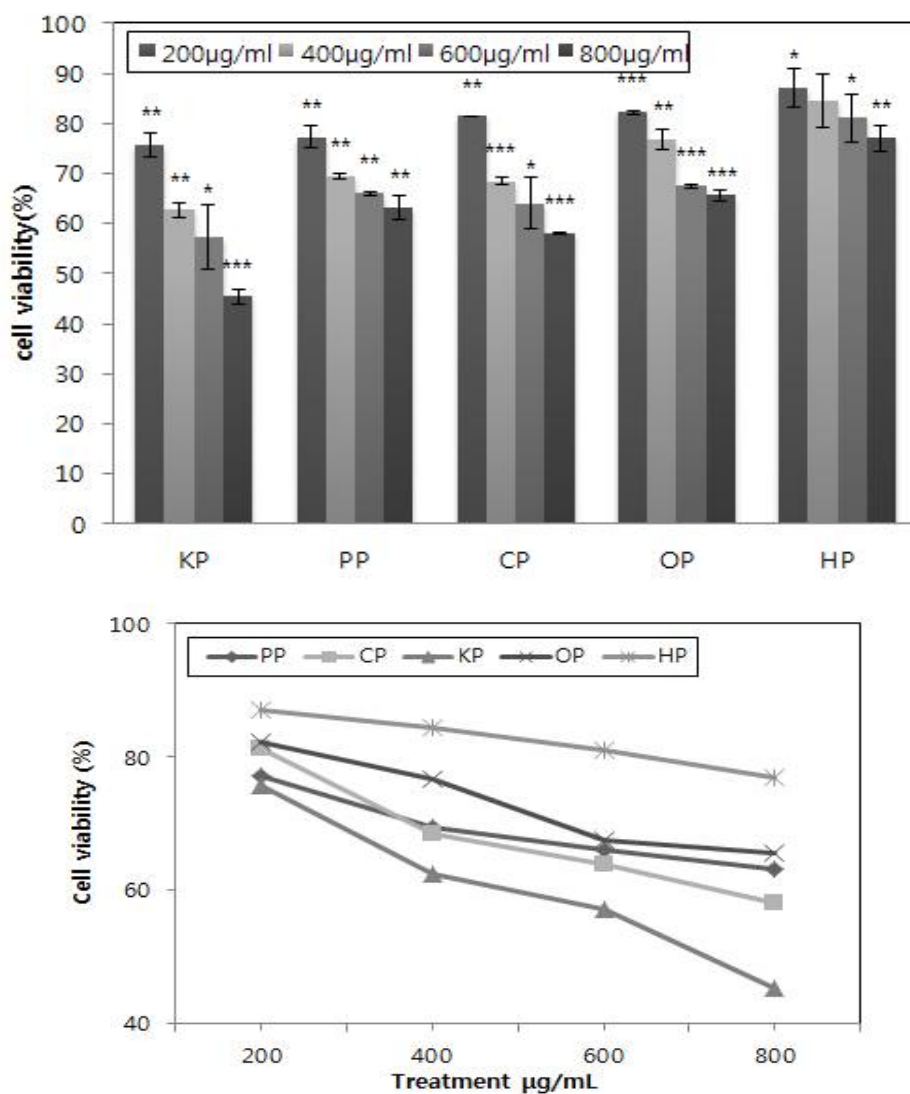


**Fig. 11. Effect of methanol extract from various green peppers on cell viability in MCF-7 cells**

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

\* significantly different from the values of control at  $p < 0.05$ , \*\* significantly different from the values of control at  $p < 0.01$ , \*\*\* significantly different from the values of control at  $p < 0.001$



**Fig. 12. Effect of methanol extract from various green peppers on cell viability in MDA-MB-231 cells**

Results are shown as mean±SD

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

\* significantly different from the values of control at  $p < 0.05$ , \*\* significantly different from the values of control at  $p < 0.01$ , \*\*\* significantly different from the values of control at  $p < 0.001$

Table 9. Effect of methanol extract from various green peppers on cell viability in A: MCF-7 cells, B : MDA-MB-231 cells

(unit :  $\mu\text{g/ml}$ )

Variety	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup>	
	MCF-7	MDA-MB-231
PP <sup>1)</sup>	970.85	1336.62
CP	1159.20	962.53
KP	826.07	719.58
OP	1083.48	1281.15
JP	1820.95	2429.17

<sup>1)</sup> PP : Phut Pepper, CP : Cheonyang Pepper, KP : Kkuari Pepper, OP : Ohi Pepper, JP : Jalapeno Pepper

<sup>2)</sup> IC<sub>50</sub> is the concentration 50% inhibition of cell proliferation in MCF-7, MDA-MB-231 cell

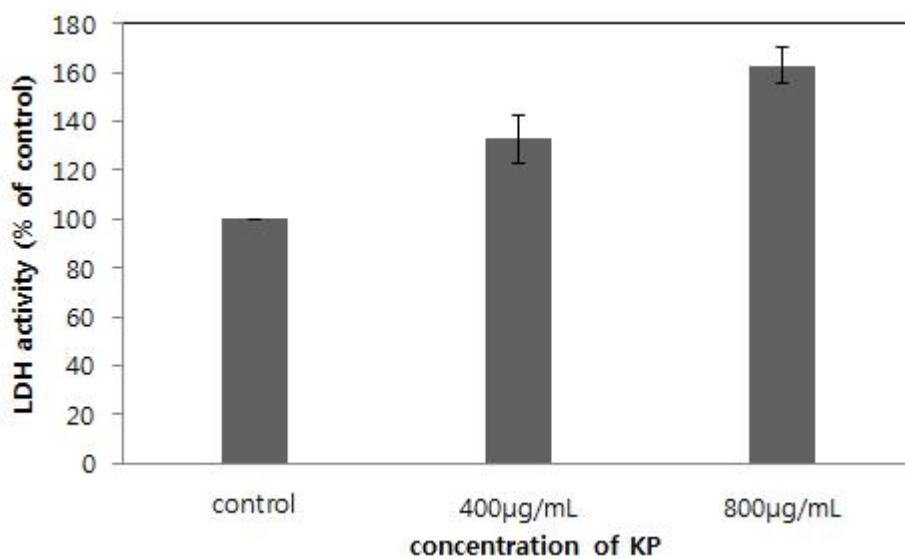
## 4.2. Necrosis 측정

세포 사멸의 형태에는 apoptosis와 necrosis가 있다. Apoptosis는 세포 자체에 의해서 계획적으로 이루어지는 반응이며, necrosis는 세포괴사에 의한 반응이다. 일반적으로 측정되는 MTT assay 등을 이용한 세포 사멸을 측정하는 것은 apoptosis와 necrosis로 인한 세포 사멸을 모두 포함한 형태이므로, 처리한 물질에 있어서 apoptosis로 인한 세포 사멸을 측정하기 위해서는 necrosis로 인한 세포 사멸을 함께 측정해야 한다. (Capua 등 2010)

Apoptosis와 necrosis로 인한 세포 사멸 효과를 측정하는데 있어서, 5가지 품종 가운데 세포 증식 억제능이 가장 높았던 파리고추 추출물을 이용하였다.

파리고추 추출물의 유방암세포에 대한 세포 사멸 효과를 측정함에 있어서, necrosis로 인한 세포 사멸을 측정하게 위하여 LDH assay를 수행하였다.

FBS로 인한 영향을 최소한으로 하기 위하여 1% FBS가 포함된 배지를 사용하였다. MCF-7 세포에서  $IC_{50}$  값을 나타낸 농도를 고려하여, 400  $\mu$ g/mL, 800  $\mu$ g/mL 농도로 파리고추 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하여 necrosis로 인한 세포 사멸 효과를 측정하였다. 추출물을 농도별로 처리한 결과(Fig 12), 대조군(100%)에 비해 400  $\mu$ g/mL으로 처리한 세포에서는 약 133%, 800  $\mu$ g/mL으로 처리한 세포에서는 약 163%의 necrosis가 일어나는 것을 확인하였다. 즉, 파리고추 추출물을 처리하였을 때, dose-dependent하게 LDH가 분비되며, plasma membrane integrity의 감소가 이루어지는 것을 알 수 있다.



**Fig. 13.** Effect of Kkuari pepper extracts on necrosis using the LDH assay in MCF-7 cells

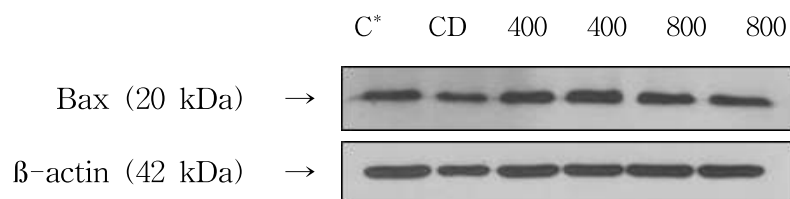
Results are shown as mean±SD

### 4.3. Apoptosis 측정

#### 4.3.1. Bax 측정

세포 내적·외적 신호에 의해서 apoptosis가 일어나게 되고, 이러한 apoptosis의 유발에는 caspase cascade를 비롯하여 Bcl-2, Bax 등의 단백질이 관여하며, 이와 관련된 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Chiarugi 등 1994, Nagata 1997). 세포 내적 pathway에서 Bcl-2 family 단백질은 미토콘드리아 내막에 위치하며, anti-apoptotic, pro-apoptotic의 기능을 가진 단백질로 이루어져 있다. Anti-apoptotic Bcl-2 family는 apoptosis를 억제하는 기능을 가지며, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 등이 있고, 반대로 apoptosis를 유도하는 pro-apoptotic Bcl-2 family로는 Bax, Bak, Box, Bid 등이 있다(Gross 등 1999).

유방암 세포 MCF-7 에서의 apoptosis 여부를 알아보기 위하여 파리고추 추출물을 400  $\mu\text{g/mL}$ 과 800  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 Bax 단백질의 발현을 측정한 결과는 Fig 14와 같다. 대조군과 비교하여 보았을 때, 발현 정도가 더 나타난 것으로 보아, 파리고추로 인한 apoptosis가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.



**Fig. 14. Bax induced by Kkuari pepper in MCF-7**

\* C : Control, CD : Control with 0.5% DMSO, 400 : 400  $\mu\text{g/mL}$ , 800 : 800  $\mu\text{g/mL}$

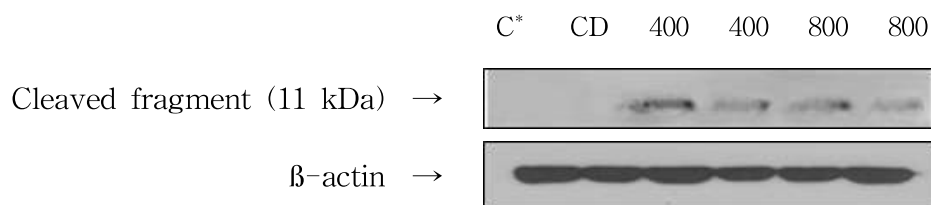
#### 4.3.2. cleaved caspase-3, PARP 측정

Caspase-3는 세포질 내에서 핵 안의 PARP로 이어지는 mechanism을 가지고 있다. 즉, 세포 밖의 다양한 조건이나 약물로 인해 caspase-8이 발현되고 이것은 caspase-3으로 이어진다. 이렇게 발현된 caspase-3가 활성화(activation)되면서 cleaved caspase-3로 바뀌고, 핵 안의 PARP의 발현을 촉진시켜 apoptosis를 일으키게 된다(Ruvo등 2000, Gorman 등 1999). 이에 파리고추 추출물을 처리하여 유방암 세포내에서 apoptosis로 인하여 활성화되어 cleavage 된 caspase-3와 PARP를 측정하였다.

유방암세포 MCF-7에 파리고추 추출물 400 µg/mL과 800 µg/mL로 처리한 결과, caspase-3가 cleavage되어 17 kDa과 19 kDa에서 발현되었으며(Fig 15), PARP는 효소가 발현되면서 116 kDa가 85 kDa으로 떨어지면서 활성화 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig 16).

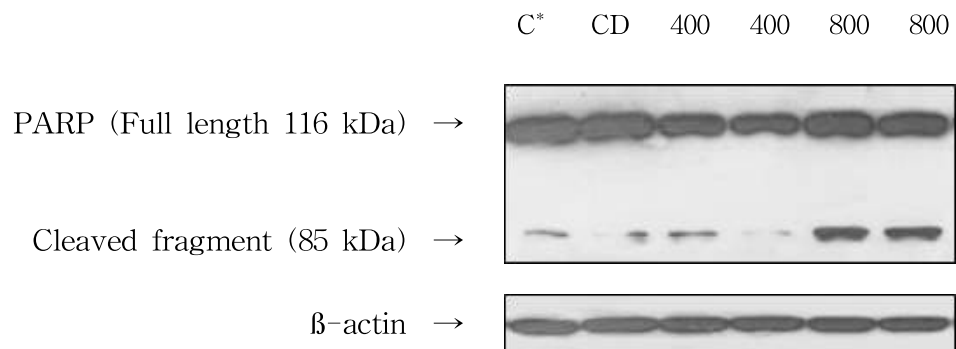
따라서 파리고추 추출물이 유방암세포에서 세포질 내의 caspase-3 촉진을 유도하고, 이렇게 발현된 caspase-3의 활성화로 PARP의 발현이 촉진되어 apoptosis 형태의 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.





**Fig. 15. Cleaved caspase-3 induced by Kkuari pepper in MCF-7**

\* C : Control, CD : Control with 0.5% DMSO, 400 : 400  $\mu\text{g/mL}$ , 800 : 800  $\mu\text{g/mL}$



**Fig. 16. PARP cleavage induced by Kkuari pepper in MCF-7**

\* C : Control, CD : Control with 0.5% DMSO, 400 : 400  $\mu\text{g/mL}$ , 800 : 800  $\mu\text{g/mL}$

## IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 5 품종 (풋고추 : Phut Pepper, 청양고추 : Cheongyang Pepper, 파리고추 : Kkuari Pepper, 오이고추 : Ohi Pepper, 할라피뇨 : Jalapeno Pepper)을 이용하여 품종에 따른 flavonoids를 분석하고, 기능성 성분 및 항산화 활성을 측정하여 생리활성을 알아보려고 하였다. 또한 5 가지 품종 중 활성이 가장 좋은 파리고추 추출물을 이용하여 유방암세포에서 apoptosis로 인한 세포 사멸 효과의 측정을 통하여 유방암의 예방 및 치료에 있어서 잠재적인 가치를 알아보려고 하였다.

1. 풋고추, 청양고추, 파리고추, 오이고추, 할라피뇨 5종의 기능성 성분으로 flavonoids 와 vitamin C 함량을 측정한 결과, 주요 플라보노이드는 luteolin, quercetin, apigenin 이었으며, 대부분의 고추에서 luteolin의 함량이 가장 높고, quercetin, apigenin의 순으로 함유되어 있었다. 5가지 품종의 고추 가운데 파리고추에서 luteolin, quercetin, apigenin의 함량이 유의적으로 가장 높게 나타났다. 비타민 C의 함량은 파리고추가 가장 높았으며, 청양고추, 할라피뇨, 풋고추, 오이고추의 순으로 나타났다.

2. 5가지 품종의 green pepper에 함유된 총 폴리페놀의 양은 할라피뇨가 가장 높게 측정되었으며 다음으로 파리고추가 높은 함량이 측정되었으나, 품종간의 유의적이 차이는 나타나지 않았다. 총 플라보노이드의 함량은 파리고추가 유의적으로 가장 높게 측정되었고, 할라피뇨가 가장 적게 측정되었다.

3. Green pepper 추출물의 DPPH, ABTS 자유기 소거 활성능을 측정한

결과, 농도에 따라 통계적으로 유의적인 효과를 보였다. 품종별로 살펴보면, 5가지 품종 중에서 파리고추의 소거 활성능이 모든 농도에서 가장 높은 결과를 나타내었다.

4. Green pepper 추출물의 세포 증식 억제 효과를 측정하기 위하여 유방암 세포 MCF-7과 MDA-MB-231 세포를 사용한 결과, 두 세포에서 모두 농도 의존적으로 세포 증식 억제 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

기능성 성분과 함께 라디칼 소거 활성능이 가장 좋았던 파리고추 추출물에서 가장 낮은  $IC_{50}$  값(MCF-7 : 826.07  $\mu\text{g/mL}$ , MDA-MB-231 : 719.58  $\mu\text{g/mL}$ )을 나타내어 다른 품종에 비해 우수한 증식 억제효과를 보였다.

5. 파리고추 추출물을 처리하여 유방암 세포주 MCF-7에서의 apoptosis 유도 단백질을 측정한 결과, Bax, cleaved caspase-3, PARP가 발현되어 파리고추 추출물이 apoptosis 형태의 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였다.

이상의 결과들을 종합하여 보면, green pepper에는 luteolin, quercetin, apigenin의 flavonoids를 비롯하여 vitamin C와 같은 기능성 성분과 페놀 화합물이 풍부하게 함유되어 있으며, 항산화 및 항암 효과가 있음을 확인하였다. 특히 파리고추는 5가지 품종의 green pepper 가운데 가장 우수한 항산화 및 항암능을 나타내었다. 또한 apoptosis 형태의 세포 사멸을 유도하는 것으로 보아 유방암의 치료 및 예방에 잠재적인 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다. 하지만 in vitro 실험의 한계점이 있을 것으로 생각되며, in vivo에 대한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

국가 암 정보센터 (2009)

농촌진흥청. 식품성분표 (2011)

보건복지부. 한국인 암 등록 조사자료 분석보고서. 2005:5-7

조병철. 고추의 품질에 미치는 생육단계와 기상환경의 영향. 고려대학교 대학원. (2010)

Baila J.C., Varnata F., Nicolasb J.C., Habriouxa G. Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7human breast cancer cells by flavonoids. Cancer Letters. 130(1-2):209-216 (1998)

Biglari F., Abbas F.M., AlKarkhi A.M., Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (Phoenix dactylifera) fruits from Iran. Food Chemistry. 107(4):1636 - 1641 (2008)

Bor J.Y., Chen H.Y., Yen G.C. Evaluation of Antioxidant Activity and Inhibitory Effect on Nitric Oxide Production of Some Common Vegetables. J. Agric. Food Chem.. 54(5):1680 - 1686 (2006)

Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol. 15:269-290 (1999)

Cancer Detection Section : Resources for health professionals (2010)

- Capua C.J., Hopson N.P., Stewart C.M.M., Johnston G.R., Neill K.L., Schaalje G.B., Lee C.M., Booth G.M. Cytotoxicity of *Atriplex confertifolia*. *Journal of Toxicology*. 2010 (2010)
- Chiarugi V, Magnelli L, Turchetti A, Cinelli M, Cavari S, Ruggiero M. Cell survival and death programmes. *Pharmacol Res* 29:101-110 (1994)
- Choi E.J., Kim G.H. Apigenin Induces Apoptosis through a Mitochondria/Caspase-Pathway in Human Breast Cancer MDA-MB-453 Cells. *J Clin Biochem Nutr*. 44(3):260 - 265 (2009)
- Chun O.K., Kim D.O., Smith N., Schroeder D., Han J.T., Lee C.Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(10):1715 - 1724 (2005)
- Dixon R.A. The phytoalexin in response : elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biological Rev*. 61:239-291 (1986)
- Gorman A., Hirt U., Orrenius S., Ceccatelli S. Dexamethasone pre-treatment interperes with apoptotic death in glioma cells. *P II:S0306-4522:00565-5* (1999)
- Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev* 13:1899-1911 (1999)
- Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. The correlation between active

- oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids Free Radical Biology and Medicine. 16(6):845 - 850 (1994)
- Hattori M., Kusumoto I.T., Namba T., Ishigami T., Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucosyltransferase from streptococcus mutans. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 38(3):717-20 (1990)
- Havesteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochemical Pharmacology. 32:1141-1148 (1983)
- Hertog M.G.L., Hollman C.H., Katan M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. J. Agric. Food Chem. 40(12):2379-2383 (1992)
- Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, Yoshida M, Sakai T, Nishino H, Kawai K. Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. Cell Structure and Function. 15(6):393-401 (1990)
- Jemal A., Murray T., Ward E., Samuels A., Ram C. Ghafoor A., .Feuer E., Thun M. Cancer Statistics. A Cancer Journal for Clinicians. 55(1):10-30 (2005)
- Jhons T., Romeo J.T. Functionality of food phytochemicals, Recent Adv. phytochemical. 33:133-159 (1999)

- Keller R.B. Flavonoids : Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources. NOVA (2009)
- Kim S.M., Cho Y.S., Sung S.K., Lee I.G., Lee S.H., Kim D.G. Antioxidative and nitrite scavenging activity of pine needle and green tea extracts. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 22(1):13-19 (2002)
- Kühnau J . The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Review of Nutrition and Dietetics. 24:117-91 (1976)
- Laks P.E., Pruner M.S. Flavonoid biocides : Structure/activity relations of flavonoid phytoalex in analogues. Phytochemistry. 28:87-91 (1989)
- Laughton M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Hoult J.R.S., Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives: Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. Biochemical Pharmacology. 42(9):1673-1681 (1991)
- Lee Y., Howard L.R., Villalon B.. Flavonoids and Antioxidant Activity of Fresh Pepper(*Capsicum annuum*) Cultivars. Journal of Food Science. 60(3):473-476 (1995)
- Lerner L.J., Jordan V.C. Development of Antiestrogens and Their Use in Breast Cancer: Eighth Cain Memorial Award Lecture. Cancer Research. 50:4177 (1990)



- Levy S.M., Herberman R.B., Maluish A.M. Pognostic risk assessment in primary breast cancer by behavioral and immunological parameters. *Health Psychology*. 4(2):99-113 (1985)
- MacDonald-Wicks L.K., Wood L.G., Garg M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(13):2046 - 2056 (2006)
- Márkus F., Daood H.G., Kapitány J., Biacs P.A. Change in the Carotenoid and Antioxidant Content of Spice Red Pepper (Paprika) as a Function of Ripening and Some Technological Factors. *J. Agric. Food Chem.* 47(1):100 - 107 (1999)
- Michael G.L. Hertog, Hollman P., Venema D.P. Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40:1591-1598 (1992)
- Mozafar A. *Plant Vitamins: Agronomic, Physiological and Nutritional Aspects* CRC Press: Boca Raton, FL (1994)
- Mozer, Michael C. The perception of multiple objects: A connectionist approach. *Neural network modeling and connectionism*. Cambridge, MA, US: The MIT Press. 217 (1991)
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88:355-365 (1997)

Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Rio D.D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 133(9):2812–2819 (2003)

Pellegrini N., Serafini M., Salvatore S., Rio D.D., Bianchi M., Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition & Food Research.* 50(11):1030–1038 (2006)

Ratna W.N., Simonelli J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. *Life Science.* 70:1577–1589 (2002)

Reed J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* 387:773–776 (1997)

Reed J.C., Korsmeyer S.J, Xiao Y., Yang E., Zha J., Sedlak T., Oltvai Z. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Cell.* 74:609–619 (1994)

Rocheffort H., Capony F., Garcia M., Cavaillès V., Freiss G., Chambon M., Morisset M., Vignon F. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: A role in carcinogenesis?. *Journal of Cellular Biochemistry.* 35(1):17 - 29 (1987)

Ruvo C., Amodio R., Algeri S., Martelli N., Intilangelo A., D'Ancona

- G., Esposito E. Nutritional antioxidants as antidegenerative agents, *Int. J. Devl Neuroscience*. 18:359-366 (2000)
- Sarah Y.J., Lee S.S. Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen in anticarcinogen? *Food Chem Toxicol*. 313-316 (1996)
- Schlachterman A., Valle F., Wall K.M., Azios N.G., Castillo L., Morell L., Washington A.V., Cubano L.A., Dharmawardhane S.F. Combined Resveratrol, Quercetin, and Catechin Treatment Reduces Breast Tumor Growth in a Nude Mouse Model. *Translational Oncology*. 1(1):19-27 (2008)
- Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent. apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 29:684-688 (2001)
- So F.V., Guthrie N., Chambers A.F., Carroll K.K. Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters*. 112(2) :127-133 (1997)
- Sheikh M.S., Shao A.M., Li X.S., OrdonezJ.V., Conley B.A., Wu S., Dawson M.I., Han Q.X., Chao W.R., Quick T., Niles R.M., Fontana J.A. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)-mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma. *Carcinogenesis*. 16(10):2477-2486 (1995)
- Stewart B.W., Kleihues P. World Cancer Report Lyon : WHO/International Agency for Research on Cancer. 20:175-178

(2003)

Stoner G.D., Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cellular Biochemistry*. 59(22):169 - 180 (1995)

Surh Y.J. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food and Chemical Toxicology*. 40(8):1091-1097 (2002)

Surh Y.J., Han S.S., Keum Y.S., Seo H.J., Lee S.S. Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF- $\kappa$ B and AP-1. *Biofactors*. 107-112 (2000)

Surh Y.J., Lee S.S. Capsaicin, a double-edged sword: Toxicity, metabolism, and chemoprevent potential. *Life Sci*. 1845-1855 (1995)

Sviribeley J.L., Szent-Gyorgyi A. The chemical structure of vitamin C. *Biochem. J*. 27:100-104 (1933)

The Breast Cancer Review is sponsored by the The California Department of Public Health (CDPH), Cancer Detection Section (CDS)

Verma A.K., Johnson J.A, Gould M.N. Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene- and Af-Nitrosomethylurea-induced Rat Mammary Cancer by Dietary Flavonol Quercetin. *Cancer Research*. 48:5754-5758 (1988)

- Vijayaa K., Ananthan S., Nalinib R. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp. – a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology*. 49(2):115–118 (1995)
- Wang L., Ling Y., Chen Y., Li C.L., Feng F., You Q.D., Lu L., Guo Q.L. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Cancer Letters*. 297(1):42–48 (2010)
- Wanga X., Yuana S., Wanga J., Lina P., Liub G., Lua Y., Zhanga J., Wangc W., Weid Y. Anticancer activity of litchi fruit pericarp extract against human breast cancer in vitro and in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 215(2):166–178 (2006)
- Winston G.W., Giulioz R.T. Prooxidant and Antioxidant in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 19:137–161 (1991)
- Yoo K.M., Lee K.W., Park J.B., Lee H.J., Hwang I.K. Variation in Major Antioxidants and Total Antioxidant Activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during Maturation and between Cultivars. *J. Agric. Food Chem*. 52(19):5907 – 5913 (2004)
- Yoo K.M., Kim D.O., Lee C.Y. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotech*. 16:177–182 (2007)

## Abstract

# Effects of Green Pepper on Antioxidant Activity and Induction of Apoptosis and Necrosis in Human Breast Cancer Cell Lines

Hyo-Jin, Yoon

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Pepper (*Capsicum annuum*. var.) has various phytochemicals including capsaicin and flavonoid. However, studies on flavonoids in pepper are a few, compared to many researches done on capsaicin. So, we investigated total phenol, total flavonoid contents, antioxidant activity and antiproliferative activity though apoptosis on human breast cancer cell line (MCF-7, MDA-MB-231). This study was carried out to determine whether green pepper have a potential to prevent proliferation of human breast cancer.

Four varieties of Korean green peppers (PP : Phut Pepper, CP : Cheongyang pepper, KP : Kkuri Pepper, OP : Ohi pepper) and one foreign green pepper (JP : Jalapeno Pepper) were used. Major flavonoids of green pepper were luteolin, quercetin, and apigenin. Content of luteolin was the highest in green pepper, especially in KP. The amounts of vitamin C were the highest in KP, followed by CP,

JP, PP, and OP. The contents of total phenol were the highest in KP. KP had highest contents of total flavonoid. For antioxidant activity using DPPH·ABTS radical scavenging activity, KP had the most potent antioxidant activity, indicating the correlation between the content of flavonoid and vitamin C and the antioxidant activity.

In the result of antiproliferative activity on human breast cancer cell, KP had the highest antiproliferative effect ( $IC_{50}$  826.07  $\mu$ g/ml in MCF-7, 719  $\mu$ g/mL in MDA-MB-231).

KP extracts exhibited moderate cytotoxicity caused by necrosis against the cancer cell lines, in a dose-dependent manner, as measured by against the untreated control.

To confirm the apoptotic activity, modulations of Bax, cleaved caspase-3, and PARP enzyme expression were evaluated by western blot, and KP showed dose dependent induction of apoptosis on breast cancer cell.

These results suggest that green pepper has many functional compounds including flavonoids such as luteolin, quercetin, and apigenin, and vitamin C. Also, KP had the highest antioxidant activity and apoptotic activity among the five tested varieties.

In conclusion, green pepper has significant antioxidant activity and can be a possible candidate for treatment of breast cancer.

Keyword : green pepper, cultivar, flavonoid, antioxidant, necrosis, apoptosis

Student number : 2010-23612